

- [20] 潘 莉, 张晓峰, 王明奎, 等. 祁连山牙菜化学成分研究[J]. 中草药, 2002, 33(7): 10-13.
- [21] 黄艳萍, 宋家玲, 吴继平, 等. 凉粉草化学成分分离鉴定[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(6): 77-81.
- [22] Yao C Y, Song Z J, Ruan L J, et al. A new methoxylated flavone from *Lonicera hypoglaucia* and its chemotaxonomic significance[J]. *Biochem Syst Ecol*, 2021, 97: 1-4.
- [23] Xue H Q, Ma X M, Wu S X, et al. Xanthones from *Gentianopsis paludosa*[J]. *Chem Nat Compd*, 2011, 46(6): 979-981.

俄色叶 HPLC 指纹图谱建立及 7 种成分测定

徐 俊, 陈华林, 陈 蓉, 康晋梅, 李 敏*

(成都中医药大学, 中药材标准化教育部重点实验室, 省部共建西南特色中药资源国家重点实验室, 四川成都 611137)

摘要:目的 建立俄色叶 HPLC 指纹图谱, 并测定绿原酸、金丝桃苷、异槲皮苷、槲皮苷、根皮苷、槲皮素、根皮素的含量。方法 该药材 75% 甲醇的分析采用 Inertsil ODS-3 色谱柱 (4.6 mm×250 mm, 5 μm); 流动相乙腈-0.1% 磷酸; 梯度洗脱; 体积流量 1 mL/min; 柱温 30 ℃; 检测波长 340 nm。采用中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2012A 版计算相似度, 建立指纹图谱, 通过 SPSS 25.0 软件进行聚类分析。结果 13 批样品 HPLC 指纹图谱中有 17 个共有峰, 相似度均大于 0.9。7 种成分在各自范围内线性关系良好 ($r \geq 0.9995$), 平均加样回收率为 96.4%~100.1%, RSD 为 0.7%~2.9%。结论 该方法简便准确, 可为综合评价俄色叶质量提供参考。

关键词: 俄色叶; 指纹图谱; 化学成分; HPLC

中图分类号: R284.1

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2022)06-1854-05

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2022.06.023

Establishment of HPLC fingerprints and determination of seven constituents for Eseye

XU Jun, CHEN Hua-lin, CHEN Rong, KANG Jin-mei, LI Min*

(Key Laboratory for Standardization of Chinese Herbal Medicine, State Key Laboratory of Southwestern Chinese Medicine Resources, College of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China)

KEY WORDS: Eseye; fingerprints; chemical constituents; HPLC

俄色叶为蔷薇科苹果属植物变叶海棠 *Malus toringoide* (Rehd.) Hughes. 或花叶海棠 *Malus transitoria* (Batal.) Schneid. 的干燥叶及叶芽^[1], 在《四部医典》^[2]、《晶珠本草》^[3]、《藏药晶镜本草》^[4]中均有记载, 具有攻坚化积、除腻涤滞、保肝利胆的功效, 它已被开发的雪域俄色茶^[5-9]、功能性食品^[10-11]、保肝药物^[12-13]、俄色黄酮分子胶囊^[14]、俄色-A 毛囊靶向脂质体^[15]、俄色总黄酮缓

释栓剂与片剂^[16-17]、俄色黄酮微囊^[18]、俄色黄酮-β-环糊精包合物^[19]、复方颗粒剂^[20-21]等, 在药用、食用方面均具有重要价值。另外, 该属植物包括多种海棠, 在性状、成分方面存在相似性^[22]。

目前, 俄色叶质量标准仅以根皮素为含量测定指标, 不能有效地控制其质量^[23]。因此, 建立俄色叶 HPLC 指纹图谱, 并同时测定绿原酸、金丝桃苷、异槲皮苷、槲皮苷、根皮苷、槲皮素、

收稿日期: 2021-05-25

基金项目: 四川省科技计划项目 (2020YFS0495); “杏林学者”学科人才科研提升计划 (CXTD2018016)

作者简介: 徐 俊 (1996—), 女, 硕士生, 研究方向为中药品种、质量与资源开发应用。Tel: 18408287885, E-mail: 2950771580@qq.com

*通信作者: 李 敏 (1962—), 女, 教授, 博士生导师, 研究方向为中药品种、质量及资源。Tel: 13980038316, E-mail: 028limin@163.com

根皮素的含量, 以期为完善该药材质量标准提供参考。

1 材料

1.1 仪器 高效液相色谱仪 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司); KQ-500DE 型数控超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司); SQP 电子分析天平 [赛多利斯科学仪器 (北京) 有限公司]; Milli-Q Advantage A10 超纯水仪 (德国默克密理博公司)。

1.2 试剂与药物 绿原酸 (批号 wkq16052705)、金丝桃苷 (批号 wkq16050305)、异槲皮苷 (批号 wkq16050607)、槲皮苷 (批号 wkq17113002)、根皮苷 (批号 wkq17122002)、槲皮素 (批号 wkq17072005)、根皮素 (批号 wkq17081715) 对照品均购自四川省维克奇生物科技有限公司, 纯度均大于 98 %。乙腈、甲醇为色谱纯; 磷酸等其他试剂均为分析纯; 水为超纯水。

1.3 药材 俄色叶共 13 批 (编号 S1~S13), 经成都中医药大学李敏教授鉴定为蔷薇科植物变叶海棠 *Malus toringoides* (Rehd.) Hughes. 或花叶海棠 *Malus transitoria* (Batal.) Schneid. 的干燥叶或叶芽, 具体信息见表 1。

表 1 样品信息

Tab. 1 Information of samples

编号	基原	采集部位	编号	基原	采集部位
S1	变叶海棠	叶芽	S8	变叶海棠	叶芽
S2	花叶海棠	叶芽	S9	花叶海棠	叶芽
S3	变叶海棠	叶芽	S10	变叶海棠	叶
S4	花叶海棠	叶芽	S11	花叶海棠	叶
S5	变叶海棠	叶芽	S12	变叶海棠	叶
S6	花叶海棠	叶芽	S13	花叶海棠	叶
S7	变叶海棠	叶芽			

2 方法

2.1 HPLC 指纹图谱建立

2.1.1 色谱条件 Insertsil ODS-3 色谱柱 (4.6 mm×250 mm, 5 μm); 流动相乙腈 (A) -0.1% 磷酸 (B), 梯度洗脱 (0~10 min, 10%~12% A; 10~15 min, 12%~15% A; 15~16 min, 15%~18% A; 16~60 min, 18% A; 60~65 min, 18%~22% A; 65~70 min, 22%~25% A; 70~80 min, 25%~30% A; 80~85 min, 30%~40% A; 85~92 min, 40% A; 92~100 min, 40%~52% A); 体积流量 1.0 mL/min; 柱温 30 ℃; 检测波长 340 nm; 进样量 10 μL。

2.1.2 对照品溶液制备 精密称取对照品绿原酸、槲皮素各 1 mg, 金丝桃苷、异槲皮苷、槲皮苷各 2 mg, 根皮苷 10 mg, 根皮素 5 mg, 置于 25 mL 量

瓶中, 50% 甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得。

2.1.3 供试品溶液制备 取药材细粉 (过四号筛) 约 0.5 g, 精密称定, 置于具塞锥形瓶中, 精密加入 25 mL 75% 甲醇, 称定质量, 超声提取 45 min, 放冷, 75% 甲醇补足减失的质量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

2.1.4 方法学考察

2.1.4.1 精密度试验 取同一份供试品溶液 (S2), 在“2.1.1”项色谱条件下进样测定 6 次, 测得各成分色谱峰相对峰面积 RSD 为 0.12%~2.06%, 相对保留时间 RSD 为 0.02%~0.34%, 表明仪器精密度良好。

2.1.4.2 重复性试验 取同一批样品 (S2), 按“2.1.3”项下方法平行制备 6 份供试品溶液, 在“2.1.1”项色谱条件下进样测定, 测得各成分色谱峰相对峰面积 RSD 为 0.07%~2.42%, 相对保留时间 RSD 为 0.03%~0.23%, 表明方法重复性良好。

2.1.4.3 稳定性试验 取同一份供试品溶液 (S2), 于 0、2、4、8、12、24 h 在“2.1.1”项色谱条件下进样测定, 测得各成分色谱峰相对峰面积 RSD 为 0.28%~2.71%, 相对保留时间 RSD 为 0.01%~0.57%, 表明溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.1.5 图谱生成 取 13 批样品, 按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液, 在“2.1.1”项色谱条件下进样测定, 记录色谱图, 将相关数据导入“色谱指纹图谱相似度评价系统”2012A 版, 采用共有模式图谱生成对照指纹图谱 (R)^[24]。同时取对照品溶液适量, 对其中 7 个色谱峰进行指认定性, 见图 1~2。由此可知, 13 批样品 HPLC 指纹图谱中有 17 个共有峰, 指认出其中 7 个, 即 5 号峰为绿原酸, 8 号峰为金丝桃苷, 9 号峰为异槲皮苷, 11 号峰为槲皮苷, 12 号峰为根皮苷, 13 号峰为槲皮素, 14 号峰为根皮素。再采用中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2012A 版, 以共有模式图谱 (R) 为参照, 发现其相似度良好, 为 0.948~0.993。

2.2 聚类分析 以 7 个共有峰的相对峰面积为原始数据, 采用 SPSS 25.0 软件中的组间平均数联结法进行聚类分析, 结果见图 3。由此可知, 13 批样品可聚为 3 类, S1、S3、S5、S7、S8 为第 1 类, S10、S11、S12、S13 为第 2 类, S2、S4、S6、S9 为第 3 类。

2.3 7 种成分含量测定

2.3.1 色谱条件 Insertsil ODS-3 色谱柱 (4.6 mm×

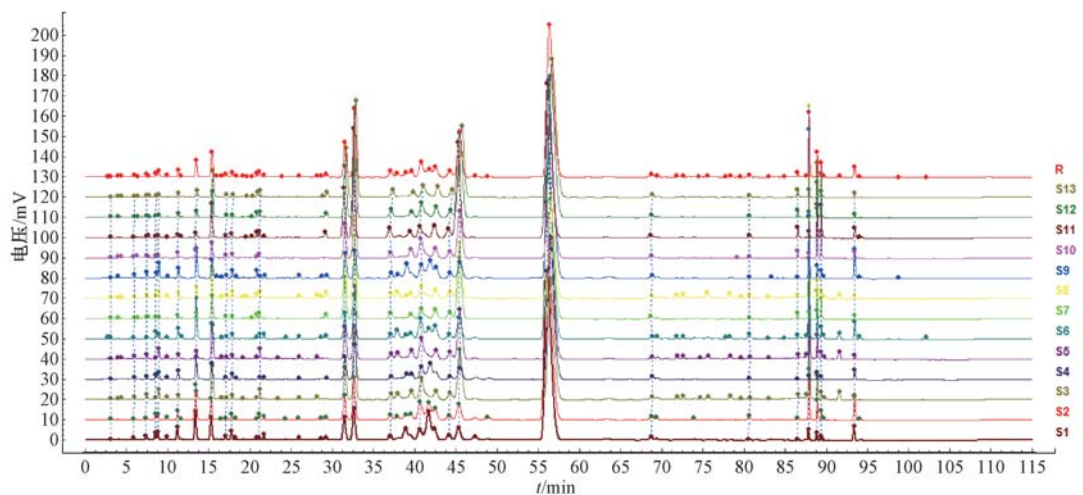
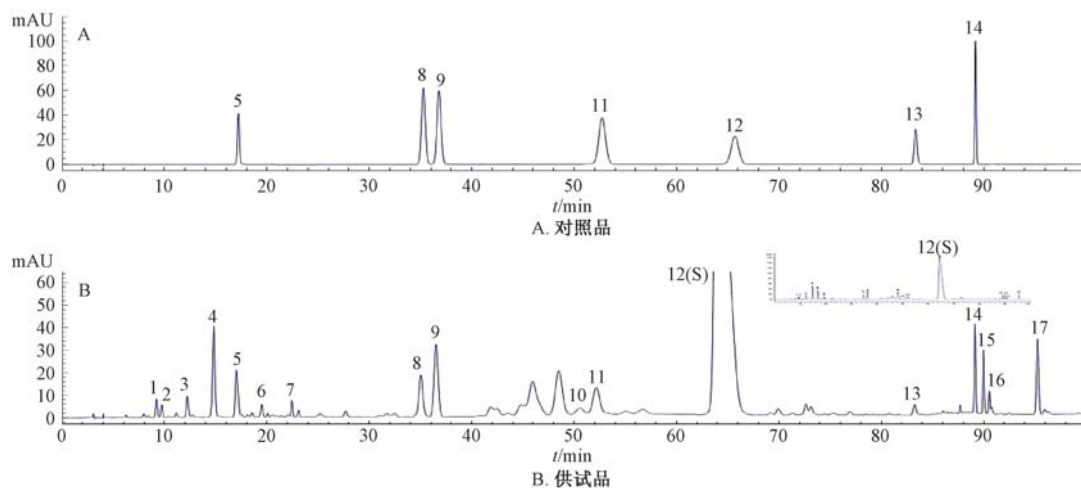


图1 13批样品 HPLC 指纹图谱
Fig. 1 HPLC fingerprints for thirteen batches of samples



5. 绿原酸 8. 金丝桃苷 9. 异槲皮苷 11. 槲皮苷 12. 根皮苷 13. 槲皮素 14. 根皮素
5. chlorogenic acid 8. hyperoside 9. isoquercitrin 11. quercetin 12. phlorizin 13. quercetin 14. phloeritin

图2 各成分 HPLC 色谱图 (I)
Fig. 2 HPLC chromatograms of various constituents (I)

250 mm, 5 μ m); 流动相乙腈 (A) -0.1% 磷酸 (B), 梯度洗脱 (0 ~ 5 min, 12% ~ 15% A; 5 ~ 15 min, 15% ~ 20% A; 15 ~ 28 min, 20% A; 28 ~ 48 min, 20% ~ 42% A; 48 ~ 50 min, 42% ~ 50% A; 50 ~ 55 min, 50% ~ 12% A); 体积流量0.7 mL/min; 柱温 30 $^{\circ}$ C; 检测波长 340 nm; 进样量 10 μ L。

2.3.2 对照品溶液制备 精密称取各对照品适量, 置于不同 25 mL 量瓶中, 75% 甲醇溶解并定容, 制得贮备液, 分别取适量至同一 10 mL 量瓶中, 75% 甲醇稀释, 即得 (绿原酸、金丝桃苷、异槲皮苷、槲皮苷、根皮苷、槲皮素质量浓度分别为 0.125、0.35、0.86、0.38、9.3、0.01、0.85 mg/mL)。

2.3.3 供试品溶液制备 同“2.1.3”项。

2.3.4 系统适应性试验 取对照品、供试品、阴性样品溶液适量, 在“2.3.1”项色谱条件下进样测定, 结果见图4。由此可知, 各成分分离度和理论塔板数良好, 阴性无干扰。

2.3.5 方法学考察

2.3.5.1 线性关系考察 精密吸取对照品溶液 4 000、2 000、1 000、600、250 μ L, 置于不同 10 mL 量瓶中, 75% 甲醇制成系列质量浓度, 在“2.3.1”项色谱条件下进样测定。以对照品峰面积为纵坐标 (Y), 进样量为横坐标 (X) 进行回归, 见表2。由此可知, 各成分在各自范围内线性关系良好。

2.3.5.2 精密度试验 取对照品溶液适量, 在

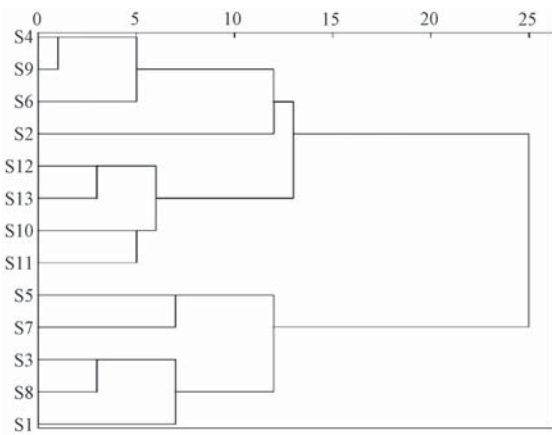
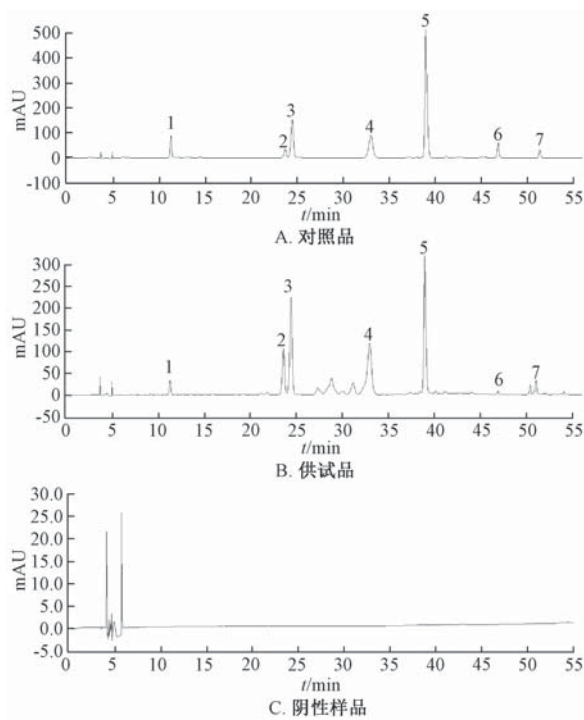


图 3 13 批样品聚类分析图

Fig. 3 Cluster analysis diagram for thirteen batches of samples



1. 绿原酸 2. 金丝桃苷 3. 异槲皮苷 4. 槲皮苷 5. 根皮苷
6. 槲皮素 7. 根皮素
1. chlorogenic acid 2. hyperoside 3. isoquercitrin 4. quercetin
5. phlorizin 6. quercetin 7. phloretin

图 4 各成分 HPLC 色谱图 (II)

Fig. 4 HPLC chromatograms of various constituents

“2.3.1”项色谱条件下进样测定 6 次, 每次 10 μ L, 测得绿原酸、金丝桃苷、异槲皮苷、槲皮苷、根皮苷、槲皮素、根皮素峰面积 RSD 分别为 1.63%、0.12%、0.22%、0.57%、0.21%、0.94%、0.85%, 表明仪器精密度良好。

2.3.5.3 重复性试验 精密称取药材粉末 (S6)

表 2 各成分线性关系

Tab. 2 Linear relationships of various constituents

成分	回归方程	<i>r</i>	线性范围/ μ g
绿原酸	$Y=395.21X+0.0879$	0.9995	3.1~50.0
金丝桃苷	$Y=457.54X+0.1204$	0.9998	8.5~139.6
异槲皮苷	$Y=462.69X+0.4421$	0.9998	42.3~690.7
槲皮苷	$Y=642.54X-1.0711$	0.9999	11.0~151.1
根皮苷	$Y=221.98X-28.952$	0.9998	580.9~7338.3
槲皮素	$Y=1960.4X+0.0684$	0.9999	0.2~4.0
根皮素	$Y=561.5X+0.462$	0.9996	20.5~341.1

6 份, 每份 0.5 g, 按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液, 在“2.3.1”项色谱条件下各进样 10 μ L 测定, 测得绿原酸、金丝桃苷、异槲皮苷、槲皮苷、根皮苷、槲皮素、根皮素峰面积 RSD 分别为 0.98%、1.15%、0.96%、1.40%、0.85%、1.34%、1.86%, 表明该方法重复性良好。

2.3.5.4 稳定性试验 取同一份供试品溶液 (S6), 室温下于 0、2、4、8、12、24 h 在“2.3.1”项色谱条件下各进样 10 μ L 测定, 测得绿原酸、金丝桃苷、异槲皮苷、槲皮苷、根皮苷、槲皮素、根皮素峰面积 RSD 分别为 0.63%、0.38%、0.54%、1.92%、0.51%、1.77%、0.60%, 表明溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.3.5.5 加样回收率试验 精密称取各成分含量已知的药材粉末 (S6) 6 份, 每份 0.25 g, 按 100% 水平加入对照品, 按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液, 在“2.3.1”项色谱条件下进样测定, 计算回收率。结果, 绿原酸、金丝桃苷、异槲皮苷、槲皮苷、根皮苷、槲皮素、根皮素平均加样回收率分别为 96.4%、99.5%、99.8%、100.1%、99.9%、99.0%、99.9%, RSD 分别为 1.3%、1.0%、0.7%、0.8%、0.4%、2.9%、0.7%。

2.3.5.6 样品含量测定 结果见表 3。

3 讨论

本实验考察不同流动相 (甲醇-0.1% 磷酸、乙腈-0.1% 磷酸)、检测波长 (256、286、330、340、345、350、355、360 nm), 结合分离度、色谱峰数目和峰形、基线平稳程度, 最终分别确定为乙腈-0.1% 磷酸、340 nm。再考察不同提取方法 (超声、加热回流)、提取溶剂 (甲醇、50% 甲醇、75% 甲醇、乙醇)、超声时间 (30、45、60 min), 最终确定为 75% 甲醇超声提取 45 min。

聚类分析结果显示, 13 批俄色叶聚为 3 类, 与该药材来源和药用部位存在一定相关性, 其中叶芽中各成分总含量高于叶中。另外, S8 与 S2、S4、

表 3 各成分含量测定结果 (% , $n=3$)
Tab. 3 Results of content determination of various constituents (% , $n=3$)

编号	绿原酸	金丝桃苷	异槲皮苷	槲皮苷	根皮苷	槲皮素	根皮素
S1	0.047 0	0.166 6	0.296 4	0.197 0	22.160 0	0.007 3	0.301 8
S2	0.071 3	0.144 6	0.297 6	0.139 9	26.701 1	0.003 2	0.598 7
S3	0.063 9	0.150 5	0.267 1	0.107 5	24.313 2	0.003 8	0.104 5
S4	0.059 0	0.225 2	0.409 0	0.229 5	24.001 8	0.004 0	0.395 1
S5	0.068 7	0.130 2	0.250 1	0.110 9	26.161 1	0.004 8	0.350 2
S6	0.010 9	0.190 0	0.467 9	0.335 9	19.616 5	0.002 4	0.297 4
S7	0.009 1	0.191 3	0.573 8	0.335 5	20.733 5	0.001 3	0.436 8
S8	0.029 4	0.100 2	0.520 2	0.294 3	19.475 4	0.002 0	0.504 5
S9	0.008 3	0.331 9	0.754 3	0.624 2	20.749 5	0.003 0	0.304 1
S10	0.007 1	0.135 6	1.093 6	0.607 4	23.328 0	0.002 5	0.539 3
S11	0.003 1	0.298 3	0.682 2	0.596 3	20.770 5	0.002 7	0.091 2
S12	0.095 0	0.182 0	0.466 0	0.372 0	19.419 0	0.003 4	0.547 0
S13	0.005 3	0.210 5	0.534 5	0.411 6	21.789 4	0.003 1	0.458 1
平均值	0.036 8	0.189 0	0.508 7	0.335 5	22.247 6	0.003 3	0.379 1

S9 的相似度较低,表明不同基原俄色叶在成分含量上可能存在一定差异。

俄色叶中异槲皮苷、槲皮苷、根皮苷、根皮素含量较高,而绿原酸、金丝桃苷、槲皮素较低。上述 7 种成分均具有保肝、抗氧化、保护心血管等药理活性^[25-30],可为全面评价俄色叶质量提供参考。

参考文献:

[1] 四川省食品药品监督管理局. 四川省藏药材标准[S]. 成都:四川科学技术出版社, 2014: 123-124.

[2] 宇妥宁玛·云丹贡波. 四部医典[M].

[3] 帝玛尔·丹增彭措. 晶珠本草[M]. 北京:民族出版社, 1986: 222.

[4] 嘎 务. 藏药晶镜本草[M]. 北京:民族出版社, 1995: 153.

[5] 谢雨蕉,雷 敏,土 布,等. 一种变叶海棠、花叶海棠保健茶的制备方法:中国, CN106852385A[P]. 2017-06-16.

[6] 雷 敏,谢雨蕉,土 布,等. 俄色红茶及其制备方法:中国, CN107535651A[P]. 2018-01-05.

[7] 雷 敏,谢雨蕉,土 布,等. 俄色砖茶及其制备方法:中国, CN107535650A[P]. 2018-01-05.

[8] 雷 敏,谢雨蕉,土 布,等. 一种俄色砖茶的加工工艺:中国, CN107535649A[P]. 2018-01-05.

[9] 雷 敏,谢雨蕉,土 布,等. 一种俄色砖茶的制备方法:中国, CN107535648A[P]. 2018-01-05.

[10] 青岛科技大学. 一种俄色叶沙棘功能性食品及其制备方法:中国, CN201910047846.3[P]. 2019-04-26.

[11] 青岛科技大学. 一种俄色叶余甘子功能性食品及其制备方法:中国, CN201910047835.5[P]. 2019-05-24.

[12] 李 敏,夏冬梅,周海玉. 俄色叶及其提取物在制备保肝的药物或保健食品中的用途:中国, CN105434575A[P]. 2016-03-30.

[13] 李 敏,周海玉,曾 俊. 俄色果及其提取物在制备保肝的药物或保健食品中的用途:中国, CN105878449A[P]. 2016-08-24.

[14] 沈睿娟,毛 羽,舒 莎,等. 俄色黄酮分子胶囊的制备及表征[J]. 中药材, 2016, 39(4): 837-841.

[15] 杨邦祝,毛 羽,沈睿娟,等. 俄色叶-A 毛囊靶向脂质体

制备工艺的优化[J]. 中成药, 2016, 38(5): 1018-1023.

[16] 徐作军,毛 羽,雷 敏,等. 俄色总黄酮缓释栓剂的制备工艺研究[J]. 西南民族大学学报(自然科学版), 2016, 42(5): 496-502.

[17] 谢雨蕉,雷 敏,毛 羽,等. 俄色提取物片剂及其制备方法:中国, CN107714794A[P]. 2018-02-23.

[18] 杨 旻,毛 羽,吴永康,等. ESE 黄酮微囊制备工艺的研究[J]. 西南民族大学学报(自然科学版), 2012, 38(6): 939-943.

[19] 陈 帅,朱 琳,王慧竹,等. 俄色黄酮-β-环糊精包合物及其制备方法:中国, CN107737344A[P]. 2018-02-27.

[20] 谢雨蕉,雷 敏,李 敏,等. 一种复方颗粒及其制备方法:中国, CN107684601A[P]. 2018-02-13.

[21] 李 艳,毛 羽,杨邦祝,等. 藏药 EH 复方降糖颗粒处方筛选及产品稳定性研究[J]. 西南民族大学学报(自然科学版), 2016, 42(2): 162-169.

[22] 邵 瑾. 苹果属 (*Malus* Mill.) 花楸苹果组 (*Sect. Sorbomalus* Zabel) 和山荆子组 (*Sect. Gymnomeles* Koehne) 的分类研究[D]. 阿拉尔:塔里木大学, 2019.

[23] 王 金,钟其培,王 华. 中药质量控制与评价模式的创新与发展探究[J]. 临床合理用药杂志, 2020, 13(22): 180-181.

[24] 张 森,陈 龙,朱 华,等. 石仙桃药材 HPLC 指纹图谱的建立及聚类分析[J]. 中国药房, 2019, 30(13): 1792-1795.

[25] 杨 威,衣 振,何亮亮,等. 俄色茶的化学成分研究[J]. 云南民族大学学报(自然科学版), 2017, 26(4): 270-273; 281.

[26] 王庆华,杜婷婷,张智慧,等. 绿原酸的药理作用及机制研究进展[J]. 药学报, 2020, 55(10): 2273-2280.

[27] 杨诗婷,王晓倩,廖广辉. 金丝桃苷的药理作用机制研究进展[J]. 中国现代应用药学, 2018, 35(6): 947-951.

[28] 杨 琳. 槲皮苷药理活性研究进展[J]. 亚太传统医药, 2015, 11(6): 61-63.

[29] 杨 颖,王芸芸,蒋琦辰. 槲皮素药理作用的研究进展[J]. 特种经济动植物, 2020, 23(5): 24-28.

[30] 冯 甜,王力彬,周 楠,等. 根皮素的研究进展[J]. 转化医学杂志, 2017, 6(1): 42-46.